



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |           |  |
|---|-----------|--|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b><br><b>A61K 35/74, A23L 1/03, 1/308, A23C 19/032</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/27991</b><br><b>(43) Date de publication internationale: 2 juillet 1998 (02.07.98)</b>   |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/02399<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 décembre 1997 (23.12.97)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>96/15977      24 décembre 1996 (24.12.96)      FR<br>97/00885      28 janvier 1997 (28.01.97)      FR<br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> LABORA-TOIRES STANDA S.A. [FR/FR]; 68, rue Robert Kaskoreff, F-14050 Caen Cedex (FR).<br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> ROUSSEL, Edmond, Daniel [FR/FR]; 16, rue St. Loup, F-14210 Avenay (FR). LEGRAND, Charles, Gabriel [FR/FR]; Les Ombrages N°3, 14, avenue de Creully, F-14000 Caen (FR). LEGRAND, Marc, Henri [FR/FR]; 6, allée Beauséjour, Le Vendome, F-14000 Caen (FR). ROLAND, Nathalie [FR/FR]; Bâtiment A, 62, rue Papu, F-35000 Rennes (FR).<br><b>(74) Mandataire:</b> CABINET HERRBURGER; 115, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). |           | <b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i><br><i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> |
| <b>(54) Title:</b> ABSORBABLE COMPOSITION CONTAINING PROPIONIC BACTERIA CAPABLE OF RELEASING NITRIC OXIDE IN THE HUMAN OR ANIMAL ALIMENTARY CANAL<br><b>(54) Titre:</b> COMPOSITION ABSORBABLE RENFERMANT DES BACTERIES PROPIONIQUES SUSCEPTIBLE DE DEGAGER DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LE TUBE DIGESTIF HUMAIN OU ANIMAL<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The invention concerns the use of propionic bacteria for obtaining a current feeding composition or an absorbable dietetic or medicinal composition capable of releasing physiologically significant amounts of nitric oxide in the human or animal alimentary canal.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>Utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.</p>             |           |  |

« Composition absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptible de dégager du monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal »

La présente invention concerne une composition d'alimentation courante ou une composition diététique ou médicamenteuse absorbable renfermant des bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.

Pendant de nombreuses décennies, on a totalement ignoré que le monoxyde d'azote constitue l'un des éléments nécessaires à la vie et à son maintien ; par suite jusqu'à ces quatre ou cinq dernières années, les chercheurs ne se sont pas penchés sur les bienfaits associés à la présence de cet oxyde, que ce soit en médecine, en nutrition ou en physiologie.

Ce n'est que tout dernièrement que l'on a attribué au monoxyde d'azote un nombre impressionnant de fonctions physiologiques et que l'on a émis l'hypothèse que ce gaz pouvait être impliqué au premier chef dans des fonctions aussi diverses que le contrôle de la pression artérielle, la fonction cytotoxique non spécifique des macrophages, l'agrégation plaquettaire et la neurotransmission ou encore le contrôle de la motricité du tube digestif.

A partir de cette supposition, les recherches portant sur le monoxyde d'azote se sont multipliées et l'importance de ce gaz a pu être confirmée.

Il est connu que le monoxyde d'azote, qui est un gaz très instable (demi-vie inférieure à 5 secondes dans les systèmes biologiques), est produit par biosynthèse au sein de l'organisme humain ou animal à partir de la L-arginine par un groupe d'enzymes dénommées NO-synthases (NOS) dont il existe deux types principaux, à savoir d'une part les NOS constitutives qui sont exprimées notamment dans les cellules endothéliales, les plaquettes sanguines et les neurones et, d'autre part, les NOS inductibles qui sont exprimées principalement par certaines cellules du système immunitaire (macrophages et

L'invention se rapporte, en conséquence, à l'utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de  
5 dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.

Conformément à l'invention, cette composition peut être constituée par une préparation élaborée et/ou présentée sous forme liquide (en particulier d'un liquide fermenté),  
10 sous forme déshydratée ou d'humidité intermédiaire.

Plus précisément, il est à noter que, sans pour cela sortir du cadre de l'invention, la composition peut se présenter :

- soit sous forme d'une préparation spécifique se justifiant  
15 par sa seule finalité physiologique, à savoir l'ingestion de bactéries propioniques susceptibles de dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote,
- soit sous forme d'une préparation alimentaire élaborée ayant parallèlement une finalité autre plus strictement  
20 énergétique ou fonctionnelle ; dans ce dernier cas, les bactéries propioniques peuvent être ajoutées ou incorporées dans les aliments eux-mêmes notamment dans des fromages, dans des fibres alimentaires telles que des flocons de céréales, ou encore dans des laits fermentés, crèmes desserts,  
25 gâteaux et/ou boissons bienfaisantes, etc..

Conformément à l'invention, les bactéries propioniques peuvent être introduites sous forme de biomasse ou sous la forme d'un levain susceptible de se multiplier in situ.

30 Lorsqu'elle est déshydratée, la composition se présente, avantageusement, sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée régulièrement.

Ces fractions peuvent être ingérées directement  
35 ou être préalablement diluées dans un liquide ; elles peuvent être conditionnées sous une forme permettant de faciliter l'absorption : comprimés, sachets de poudre granulée, liquide, ...

- dosage des nitrites par système Bran-Luebbe.

En raison de la nature des extraits à analyser, une étape de purification des échantillons a été successivement mise en oeuvre par une double centrifugation (2 x 10 min., 4°C, 15 000 rpm), suivie d'une ultrafiltration sur cartouche miniprep 10 (rétention des protéines de PM > 10kD) puis d'une purification partielle par passage de l'échantillon sur résine Waters C18 (55-105 µm).

Cette méthode a, dans un premier temps, été testée sur des échantillons étalons de nitrite (Figure 1), puis sur des extraits de culture de *Lactobacillus* incubés 7 heures auxquels a été ajoutée ou non une quantité connue de nitrite (Figure 2).

La figure 1 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebbe :

- (1) d'un milieu de culture de bifidobactéries après 10 heures d'incubation,
- (2) d'une solution standard de nitrite,
- (3) de cette même solution ultrafiltrée,
- (4) de cette même solution ultrafiltrée et passée sur résine C18.

La figure 2 représente les profils colorimétriques obtenus sur une chaîne d'analyse automatique Bran Luebbe :

- (1) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 37°C,
- (2) (3) d'une solution standard contenant 410 µg de nitrite/l,
- (4) (5) d'un milieu de culture de *Lactobacillus* après 10 heures d'incubation à 37°C auxquels a été ajoutée une quantité connue de nitrite afin d'obtenir une solution à 820 µg/l de nitrite.

Ces échantillons ont été purifiés par centrifugation ultrafiltration et passage sur résine C18 dans les conditions décrites précédemment.

Conformément à ces essais, aucune accumulation de nitrite n'a pu être détectée que ce soit à partir

Cette figure montre que la quantité de nitrite est maximale à 24 heures puis diminue ensuite de façon significative après 48 et 72 heures d'incubation.

On peut raisonnablement penser que cette chute résulte de la réduction du nitrite en NO, N<sub>2</sub>O ou autres composés par la nitrite réductase.

Conformément à l'invention, on a pu prouver que l'accumulation de NO<sub>2</sub> dépend des espèces ou souches de bactéries propioniques mises en oeuvre.

Cette situation a été vérifiée par les essais résumés ci-dessous :

**3 - Mise en évidence et comparaison des accumulations de nitrite dans le milieu de culture dans le cas de 9 souches de 4 espèces différentes de bactéries propioniques**

Conformément à cet essai, on a étudié les souches P20, P23, 2408, 2410, 2500 et 2501 de l'espèce *P.freudenreichii* et les souches TL221, TL223 et TL207 appartenant respectivement aux espèces *P.thoenii*, *P.acidipropionici* et *P.jensenii*.

Il est à noter que les souches TL (technologie laitière) sont des souches appartenant à l'INRA-LRTL, tandis que la souche P23 (ou ITG23) a été enregistrée à la Collection Nationale des Cultures de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous le numéro I-1804 en date du 18.12.96.

Les différentes souches de bactéries propioniques (1 g de lyophilisat ou 5 ml de culture fraîche) ont été cultivées sur 100 ml de milieu YEL contenant environ 50 µM de nitrate, selon les conditions suivantes :

- incubation à 30°C pendant 12, 24, 36 ou 48 heures,
- 3 répétitions,
- arrêt de l'incubation par ébullition,
- purification du produit par centrifugation et passage de l'extrait sur résine C18,
- accumulation de nitrite dans le milieu, mesurée par analyse sur système Bran-Luebbe,

ces différences étant indépendantes de la croissance de ces souches.

5 Ces résultats ont pu être confirmés par l'étude pour chaque souche de l'évolution de la concentration en nitrite du milieu de culture en fonction de sa turbidité et donc approximativement de la croissance bactérienne.

Les résultats de ces derniers essais sont rapportés sur la figure 5 sur laquelle chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n = 3$ .

10 Les essais susmentionnés ont été de nature à établir que, parmi les souches étudiées, la souche TL223 est la plus fortement accumulatrice de nitrites, ces nitrites disparaissant après 12 heures. Cette souche a donc été retenue dans le cadre d'essais complémentaires portant  
15 sur la mesure directe de la production de monoxyde d'azote par analyse en spectrométrie de masse en milieu anaérobie.

20 **4 - Mesure préliminaire de la production de NO par la souche TL223 sous atmosphère d'hélium**

Conformément à ces essais, les cultures ont été réalisées dans des tubes de 10 ml contenant 5 ml de milieu YEL contenant environ 50  $\mu$ M de nitrate et 0,25 ml de culture fraîche de la souche TL223.

25 L'atmosphère des tubes a été immédiatement évacuée par un flux d'hélium (100 ml/min.) pendant 100 secondes.

L'accumulation de NO dans l'atmosphère des tubes a ensuite été mesurée au cours du temps dans les conditions suivantes :

- 30
- incubation à 30°C pendant 24, 48 ou 72 heures,
  - 4 répétitions,
  - mesure de l'accumulation de NO par analyse en spectrométrie de masse,
  - 35 • estimation de la fermentation de chaque culture mesurée par lecture de l'absorbance à 650 nm.

Lors d'un essai préliminaire, le système de purification de gaz (Roboprep G+) - spectromètre de masse

qui correspond à une turbidité proche de 1,5 DO (figure 7A).

Après environ 65 heures d'incubation (turbidité supérieure à 1,7 DO), environ 1,5  $\mu\text{g}$  de NO sont accumulés dans l'atmosphère d'hélium pour 1 ml du milieu de culture.

L'ordre de grandeur obtenu est compatible avec les teneurs en nitrite mesurées dans le milieu pour des cultures au contact de l'air.

Dans ce dernier cas, on avait en effet pu constater (figure 5) que la souche TL223 accumulait au maximum 1,8  $\mu\text{g}$  de  $\text{NO}_2^-$ /ml pour une turbidité de 1,5 DO, ce qui correspond à environ 1,2  $\mu\text{g}$  de NO/ml.

A partir de cette mesure directe préliminaire de la production de NO par la souche TL223, on a cherché, conformément à l'invention, à confirmer la voie de synthèse de ce monoxyde d'azote, et on a eu à cet effet l'idée de rechercher si celle-ci est stimulée par un apport de nitrite ou de nitrate.

Une telle stimulation a pu être vérifiée grâce aux essais résumés ci-dessous :

#### 5 - Etude de la stimulation de la production de NO par apport de nitrite ou de nitrate

Dans le but de rechercher si la production de NO par les bactéries propioniques est possible à partir de  $\text{NO}_2^-$  ou de  $\text{NO}_3^-$ , on a recherché si l'on observe une augmentation de la production de NO par la souche TL223 lorsqu'elle est en présence de 1 mM de  $\text{KNO}_2$  ou de  $\text{KNO}_3$  (avec et sans marquage isotopique au  $^{15}\text{N}$ ).

Cette expérimentation a été effectuée dans les conditions suivantes :

- la souche TL223 a étéensemencée à 1 % dans un milieu YEL seul (témoin) ou avec addition de 1 mM de  $\text{KNO}_2$ , de  $\text{KNO}_3$  ou de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  avec un marquage isotopique à  $^{15}\text{N}$  à 50%),
- incubation à 30°C pendant 24, 48 et 72 heures,

- la figure 8B représente les variations de la turbidité en fonction du temps,
- la figure 8C représente les variations du rapport isotopique [masse 31/(masses 30+31)] en fonction du temps,
- 5 - la figure 8D représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité.

Chacune de ces figures concerne la souche TL223 cultivée sur un milieu YEL seul, en présence de 1 mM de nitrate ( $^{15}\text{NO}_3^-$  - marqué à 50 % et  $^{14}\text{NO}_3^-$ ) et en présence  
10 de 1 mM de nitrite.

Les barres verticales représentent  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n = 3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Ces figures prouvent que l'accumulation de NO  
15 chez TL223 cultivé sur 1 mM de  $\text{KNO}_3$  (marqué à l'azote 15 ou non marqué) ou sur 1 mM de  $\text{KNO}_2$  est proche de 7  $\mu\text{g}$  de NO/ml après 48 heures d'incubation à 30°C ; cette valeur est 3,5 fois supérieure à la production de NO dans le cas d'un milieu YEL non supplémenté en nitrate ou en nitrite  
20 (figure 8A). Ces différences ne sont pas dues à des variations de croissance engendrées par la composition du milieu car la turbidité en fin de croissance, est du même ordre de grandeur sur un milieu YEL seul (4,5 unités DO après 72 heures) et sur un même milieu additionné en nitrate ou en nitrite (environ 5 unités DO après 72 heures  
25 - figures 8B et 8D).

La figure 8C révèle que l'apport de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$  marqué à 50 % permet d'obtenir du NO avec un marquage à environ 40 % après 48 heures d'incubation : l'azote de masse 15  
30 apporté sous forme de nitrate est donc retrouvé dans le NO synthétisé par la souche TL223.

On a, en outre observé que lorsque la souche TL223 est cultivée sur  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ , le profil du pic de masse 31 ( $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ ) augmente très fortement par rapport au NO analysé sur un milieu YEL contenant du nitrate non marqué, ce qui permet de confirmer cette situation.  
35

De plus, l'addition de 1 mM de  $\text{KNO}_3$  ou de  $\text{KNO}_2$  non marqué entraîne une production de NO avec un rapport



Sur ces figures, les concentrations en nitrate ont été corrigées en tenant compte de la présence d'environ 50  $\mu\text{M}$  de nitrate dans le milieu YEL seul et sont les suivantes : 100, 150, 350, 550, 650 et 1050  $\mu\text{M}$ .

5 Les concentrations en nitrite sont les suivantes : 50, 100, 400, 800 et 1000  $\mu\text{M}$ .

Ces figures montrent que pour les gammes choisies, la production de monoxyde d'azote par la souche TL223 est proportionnelle à la concentration initiale en nitrate (figure 9A) ou en nitrite (figure 9B) du milieu YEL. Cette relation est linéaire.

Dans les deux cas, aucune phase de plateau n'a été observée, ce qui laisse supposer que les concentrations en nitrate ou nitrite utilisées ne permettent pas d'obtenir le niveau maximum d'accumulation de NO par la bactérie propionique TL223.

Il est également à noter que la présence de fortes concentrations en nitrate ou en nitrite n'affecte pas la croissance bactérienne vu que les valeurs de turbidité à 72 heures sont très proches pour toutes les concentrations qui ont été testées.

Il convient, par ailleurs, de souligner que les droites obtenues sur les figures 9A et 9B sont superposables, ce qui permet de prouver que le NO produit provient directement du nitrite ou du nitrate via la réduction de celui-ci en nitrite.

De plus, ces résultats montrent que chez la souche TL223, l'étape de réduction du nitrate en nitrite n'est pas limitante pour les concentrations en nitrate choisies dans cette expérimentation.

Il est également important de souligner que le taux de conversion du  $\text{NO}_3^-$  (figure 9C) et du  $\text{NO}_2^-$  (figure 9D) évolue en fonction de la quantité de substrat disponible, passant de 20 à 60 % lorsque la concentration en  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NO}_2^-$  passe de 1000 à 100  $\mu\text{M}$ .

Ceci suggère que la production de NO est fortement régulée et qu'elle est prioritaire par rapport à

TL223 et les 12 autres souches de bactéries propioniques, cultivées sur un milieu YEL en présence de 550  $\mu$ M de nitrate. La souche TL223 a été représentée dans chaque cas dans un but de comparaison.

5 Les barres verticales représentent  $\pm$  l'écart type de la moyenne pour  $n=3$  lorsqu'elles sont plus grandes que le symbole.

Cette figure montre l'existence de fortes divergences entre les souches propioniques.

10 De manière globale, en comparant les niveaux de production de NO après 72 heures d'incubation, on peut classer les souches en trois catégories :

- souches capables de produire de 4 à 4,5  $\mu$ g NO/ml : TL223, CNRZ80, NCDO1072 et PR75. Le rapport isotopique du NO produit par ces souches est compris entre 2 et 2,5 % (T=72 h),
- 15 • souches capables de produire environ 2  $\mu$ g NO/ml : CNRZ81, CNRZ86, CNRZ89, CNRZ277, LS2502, ITG23. Le rapport isotopique du NO produit par ces souches se situe entre 4 et 5,5 % (T=72 h),
- 20 • souches produisant moins de 1  $\mu$ g NO/ml : LS410, LS2501 et CNRZ287. Malgré la présence de 550  $\mu$ M de nitrate dans le milieu de culture, ces 3 souches n'ont produit que de très faibles quantités de NO et le rapport isotopique était de l'ordre de 10 à 13 % (T=72 h). Ces valeurs suggèrent que les pics de masses 30 et 31 détectés chez ces bactéries pourraient ne pas correspondre à du monoxyde d'azote.
- 25

Il est à noter que chez les souches appartenant aux deux premières catégories, le NO produit ne diminue pas en fin de croissance et qu'il ne semble donc pas réutilisé par les bactéries propioniques : il y a donc accumulation du NO.

30

La figure 11 représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité chez les 13 souches de bactéries propioniques susmentionnées, cultivées sur milieu YEL en présence de 550  $\mu$ M de nitrate.

35

|                           | Concentration<br>en $\text{NO}_3^-$ |     |     | Concentration<br>en $\text{NO}_2^-$ |     |     | Production de<br>NO |     |     |
|---------------------------|-------------------------------------|-----|-----|-------------------------------------|-----|-----|---------------------|-----|-----|
|                           | 24h                                 | 48h | 72h | 24h                                 | 48h | 72h | 24h                 | 48h | 72h |
| <i>P. freudenreichii</i>  |                                     |     |     |                                     |     |     |                     |     |     |
| LS410                     | 674                                 | 638 | 596 | 0                                   | 5   | 22  | 13                  | 18  | 23  |
| LS2501                    | 645                                 | 649 | 406 | 6                                   | 13  | 215 | 12                  | 26  | 35  |
| LS2502                    | 338                                 | 0   | 0   | 176                                 | 122 | 16  | 12                  | 53  | 72  |
| ITG23                     | 441                                 | 218 | 24  | 11                                  | 246 | 278 | 10                  | 36  | 62  |
| CNRZ89                    | 595                                 | 160 | 42  | 16                                  | 171 | 154 | 10                  | 38  | 74  |
| CNRZ277                   | 559                                 | 435 | 246 | 17                                  | 3   | 85  | 12                  | 42  | 66  |
| CNRZ81                    | 0                                   | 0   | 0   | 400                                 | 12  | 0   | 26                  | 66  | 71  |
| <i>P. acidipropionici</i> |                                     |     |     |                                     |     |     |                     |     |     |
| TL223                     | 0                                   | 0   | 0   | 271                                 | 0   | 0   | 71                  | 149 | 152 |
| NCDO1072                  | 0                                   | 2   | 0   | 370                                 | 3   | 0   | 50                  | 148 | 146 |
| PR75                      | 11                                  | 2   | 0   | 185                                 | 1   | 0   | 91                  | 147 | 146 |
| CNRZ80                    | 0                                   | 0   | 0   | 146                                 | 0   | 0   | 93                  | 136 | 140 |
| CNRZ86                    | 594                                 | 491 | 0   | 14                                  | 41  | 405 | 9                   | 28  | 62  |
| CNRZ287                   | 624                                 | 570 | 646 | 0                                   | 0   | 5   | 9                   | 20  | 29  |

Ce tableau permet de faire les constatations suivantes :

- 5 - les souches produisant 4  $\mu\text{g}$  NO/ml sont capables de réduire entièrement le nitrate disponible (soit 550  $\mu\text{M}$ ) après 24 heures d'incubation. De plus, elles peuvent réduire totalement le nitrite obtenu au cours des 48 premières heures d'incubation
- 10 - les souches LS410 et CNRZ287, très faibles productrices de NO, ne sont pas capables d'absorber significativement le nitrate présent dans le milieu.
- chez les souches présentant une accumulation intermédiaire de NO, on peut observer des évolutions des teneurs en nitrate et en nitrite très différentes
- 15 traduisant des vitesses d'absorption du  $\text{NO}_3^-$  et/ou de réduction du  $\text{NO}_3^-$  et du  $\text{NO}_2^-$  très différentes. Ainsi, la souche CNRZ81 est capable de réduire la totalité du nitrate après 24 heures d'incubation. Après 48 heures,

centration importante de NO, ce très rapidement (pour des valeurs de turbidité relativement faibles).

Selon une autre caractéristique de l'invention, cette composition renferme des bactéries propioniques appartenant à au moins l'une des souches ITG23, CNRZ81, CNRZ89, CNRZ277 et LS2502 de l'espèce *P.freudenreichii*.

Il est à noter que, conformément à une autre caractéristique de l'invention, la composition peut également renfermer d'autres bactéries telles que des bifidobactéries et/ou des bactéries lactiques.

Pour compléter les résultats obtenus ci-dessus, on a effectué des tests sur deux types de bactéries non propioniques : *E.coli* et *Lactobacillus farciminis* connues pour leur aptitude à réduire les nitrites.

Les résultats de ces tests sont résumés ci-dessous :

#### 7 - Etude de la production de NO par les souches *E.coli* et *L.farciminis*

Ces tests complémentaires ont principalement été effectués compte tenu de l'existence de la publication « Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products » Gudrun Wolf, Elke K. Arendt, Ute Pfähler and Walter P. Hammes - International Journal of Food Microbiology, 10 (1990) 323-330) qui mentionne que certaines bactéries lactiques (*L.farciminis*) sont capables de produire du monoxyde d'azote à partir de nitrite.

Des expériences préliminaires ont montré qu'après 5 h 30 de croissance de la souche *L.farciminis* dans du MRS additionné de 1 mM de nitrate, on ne détectait plus de nitrate ni de nitrite dans le milieu de culture.

La même constatation a été faite en ce qui concerne la souche *E.coli* après 7 h 30 de croissance sur milieu BHI additionné de 1 mM de nitrate.

Il est connu, qu'au cours de sa croissance, la souche *L.farciminis* acidifie le milieu MRS (environ pH 5 après 5-6 heures de culture).

- la figure 14B représente les variations de la production de NO en fonction de la turbidité du milieu.

Il est à noter que les valeurs obtenues pour la production de NO sont toutes nettement inférieures au seuil de 1  $\mu\text{g/ml}$  qui a été considéré ci-dessus comme significatif :  
5 il en résulte qu'il n'y a pas accumulation de NO dans les tubes de culture.

Ces résultats indiquent donc que l'absence de nitrate et de nitrite observée dans l'expérience préliminaire  
10 après respectivement 5 h 30 (*L.farciminis*) et 7 h 30 (*E.coli*) n'est pas compensée par une accumulation de NO qui pourrait être soit d'origine chimique (liée à l'acidification du milieu) soit d'origine bactérienne.

Ces résultats ont été, dans le cas de la souche  
15 *L.farciminis*, confirmés par des tests effectués sur des bactéries se trouvant sous forme de resting cells à pH régulé à 6,5 par un tampon phosphate contenant du lactate dans les conditions opératoires suivantes :

- incubation à 37°C,
- 20 - apport de nitrite à une concentration de 400  $\mu\text{M}$ ,
- flushage de l'atmosphère de chaque tube par de l'hélium pendant 100 secondes,
- trois répétitions,
- mesure de la turbidité en fin d'incubation.

25 Cette analyse a permis d'obtenir les résultats rapportés sur la figure 15 :

- la figure 15A représente les variations de la production de NO en fonction du temps d'incubation,
- la figure 15B représente les variations de la production de  
30 NO en fonction de la turbidité.

Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment, à savoir que les quantités de NO produites sont trop faibles pour être significatives et donc que la souche *L.farciminis* n'est pas susceptible d'accumuler le monoxyde  
35 d'azote. Il est toutefois possible que cette souche produise du monoxyde d'azote en début de croissance, mais que le NO éventuellement produit soit réutilisé par la bactérie.

*P.acidipropionici* (TL223 et CNRZ80) mais également dans le cas de la souche de l'espèce *P.freundenreichii* (CNRZ81). La souche TL223 est la plus productive.

Globalement, à des concentrations identiques de bactéries, la production de NO par des resting cells est du même ordre que celle observée dans le cas de bactéries cultivées sur milieu YEL.

La production de NO par des resting cells intervient essentiellement lors des cinq premières heures d'incubation ; au-delà de cette période, la production est faible.

On a ainsi pu observer qu'à 37°C, la production de NO est identique (TL223) ou légèrement supérieure (CNRZ80) à celle obtenue à 30°C.

Les avantages associés à l'ingestion de bactéries propioniques ont, en outre, été vérifiés par des investigations réalisées in vivo chez l'homme sain.

#### 9 - Etude de l'effet de l'ingestion de bactéries propioniques sur le transit intestinal chez l'homme sain

Cette étude a été réalisée en milieu hospitalier au CHU de Caen sur une série de 19 sujets masculins volontaires sains.

Au début de ce test, on a fait absorber quotidiennement à chaque volontaire 10 marqueurs radio opaques, ce pendant 8 jours consécutifs, conformément au protocole décrit dans les publications Arhan P, Devroede G, Jehannin B et coll. *Dis Colon Rectum* 1981 ; 24:625-9. et Bouchouca M, Devroede G. Arhan P et coll. *Dis Colon Rectum* 1992 ; 35:773-82.

Selon ce protocole, l'étude du transit est effectuée par comptage des marqueurs radio opaques ingérés dans les différentes aires de la cavité abdominale répartis sur un cliché d'abdomen de face. Ces aires (côlon droit, côlon gauche et rectosigmoïde) sont définies par des lignes fictives joignant la 5<sup>ème</sup> vertèbre lombaire au contour de la cavité pelvienne. Le temps de transit est calculé selon la formule  $T = 1/N \cdot n \cdot \Delta t$  ; N étant

R E V E N D I C A T I O N S

- 1°) Utilisation de bactéries propioniques pour l'obtention d'une composition d'alimentation courante ou d'une composition diététique ou médicamenteuse absorbable susceptible de  
5 dégager des quantités physiologiquement significatives de monoxyde d'azote dans le tube digestif humain ou animal.
- 2°) Utilisation selon la revendication 1,  
caractérisée en ce que  
10 la composition est constituée par une préparation déshydratée.
- 3°) Utilisation selon la revendication 2,  
caractérisée en ce que  
15 la composition se présente sous forme de fractions individuelles renfermant la dose de bactéries devant être absorbée régulièrement.
- 4°) Utilisation selon la revendication 3,  
20 caractérisée en ce que  
chaque fraction individuelle renferme plus de  $10^9$  bactéries.
- 5°) Utilisation selon la revendication 1,  
caractérisée en ce que  
25 la composition est constituée par une préparation liquide fermentée ou non.
- 6°) Utilisation selon la revendication 1,  
caractérisée en ce que  
30 la composition est une préparation élaborée, les bactéries propioniques étant ajoutées ou incorporées dans des aliments tels que des fromages ou des fibres alimentaires.
- 7°) Composition diététique ou médicamenteuse absorbable,  
35 caractérisée en ce qu'  
elle est constituée par une préparation renfermant une quantité importante de préférence plus de  $10^9$  cellules/g de souches de bactéries propioniques sélectionnées en fonction de

1/12

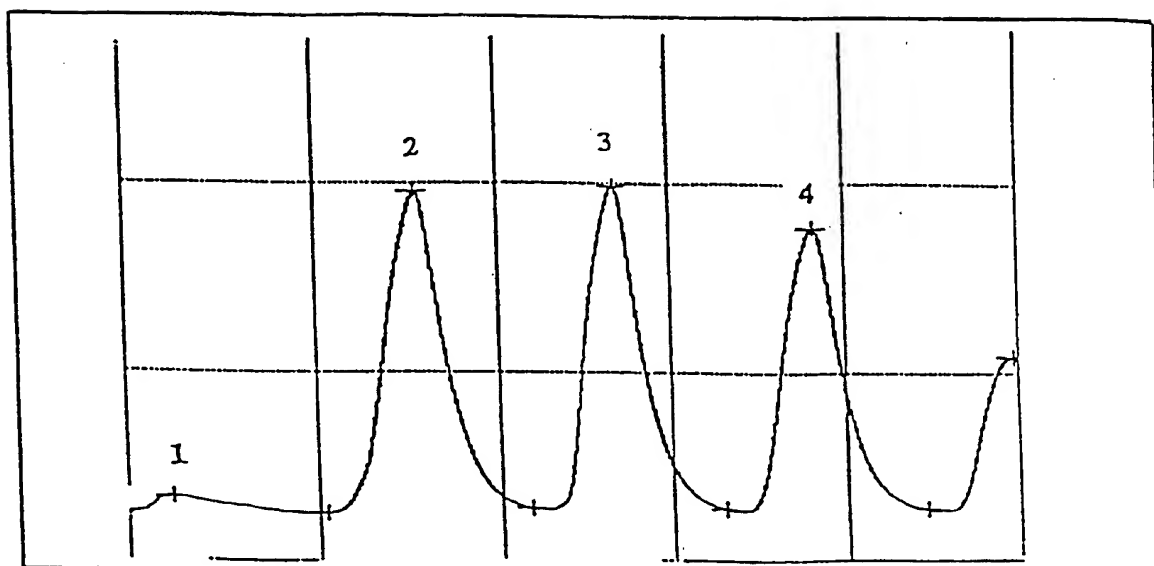


Figure 1

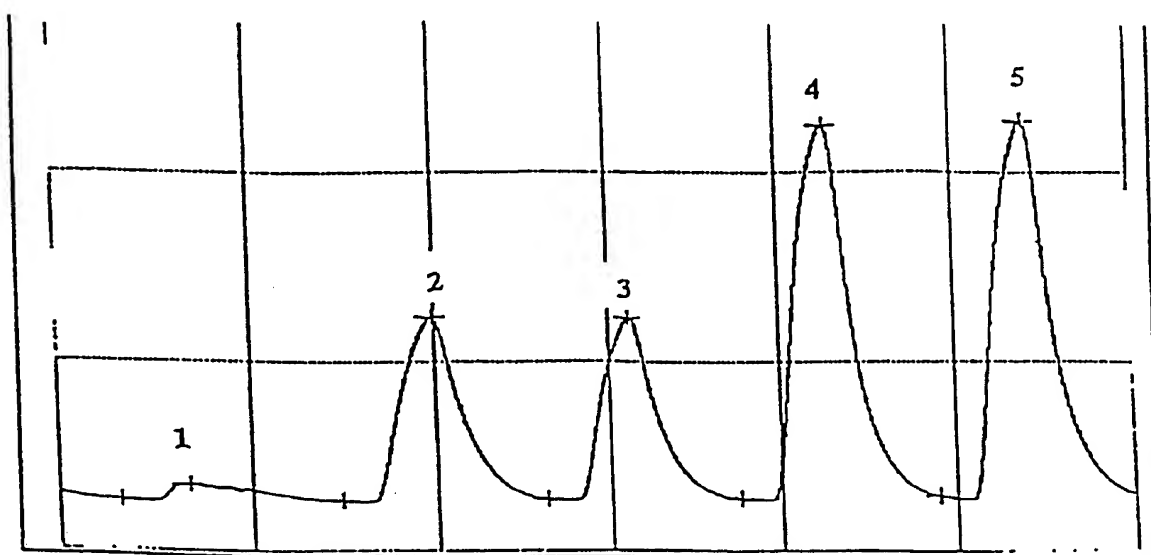


Figure 2



2/12

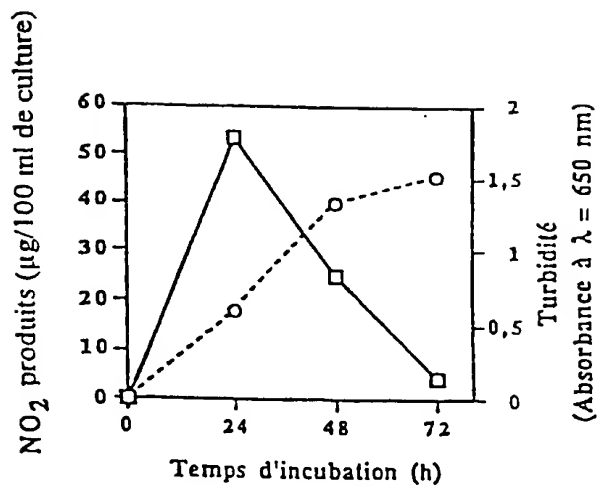


Figure 3

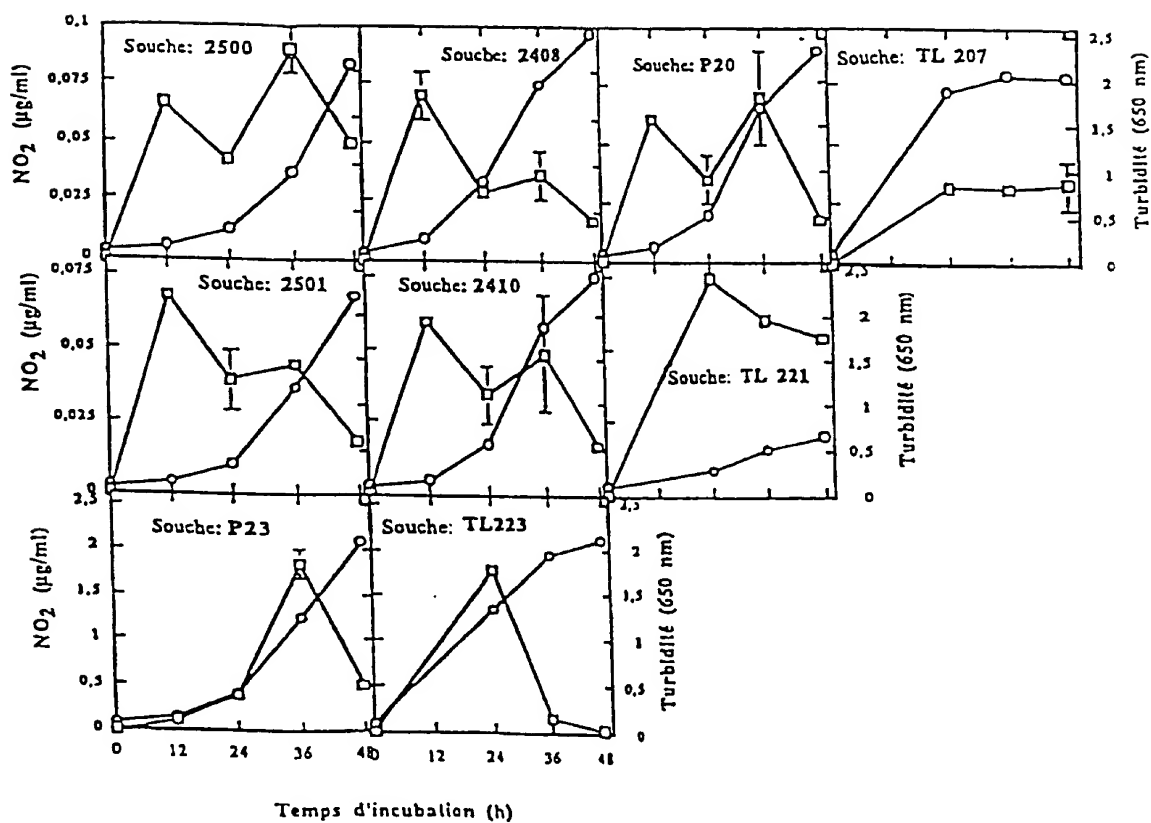


Figure 4

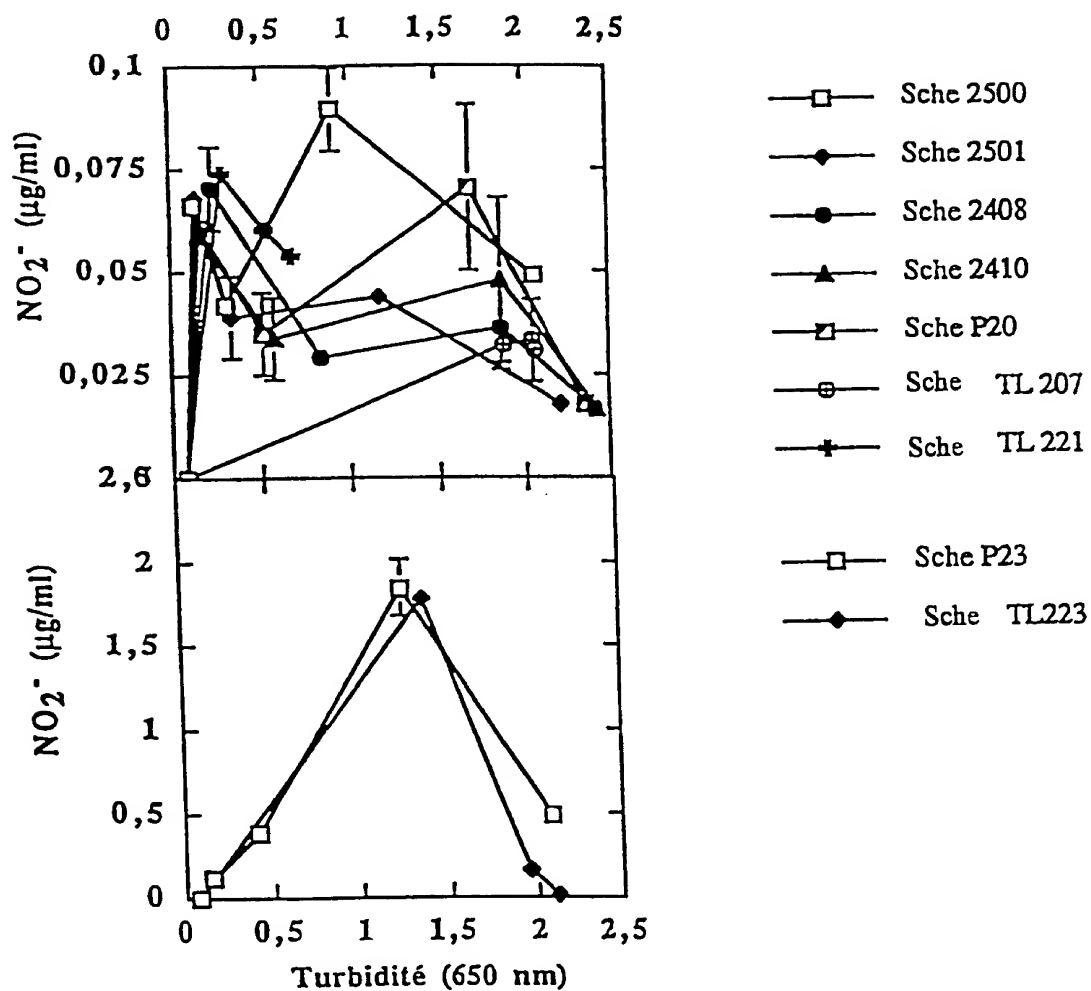


Figure 5

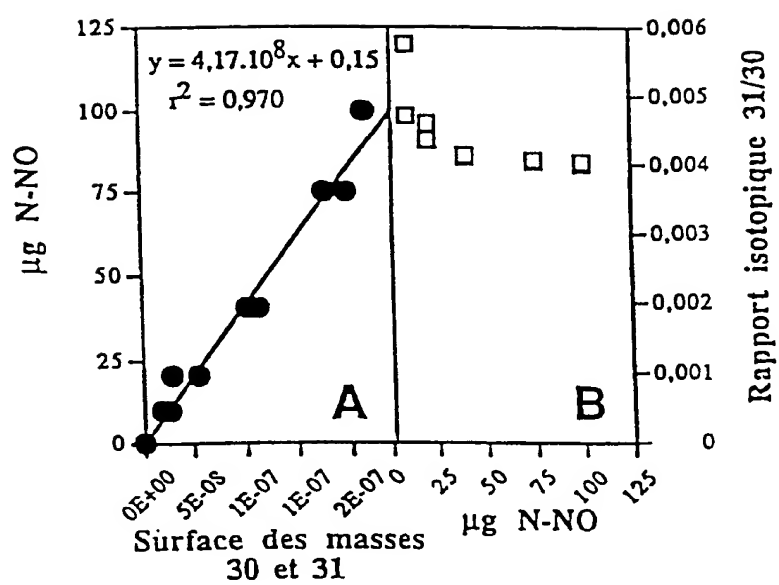


Figure 6

5/12

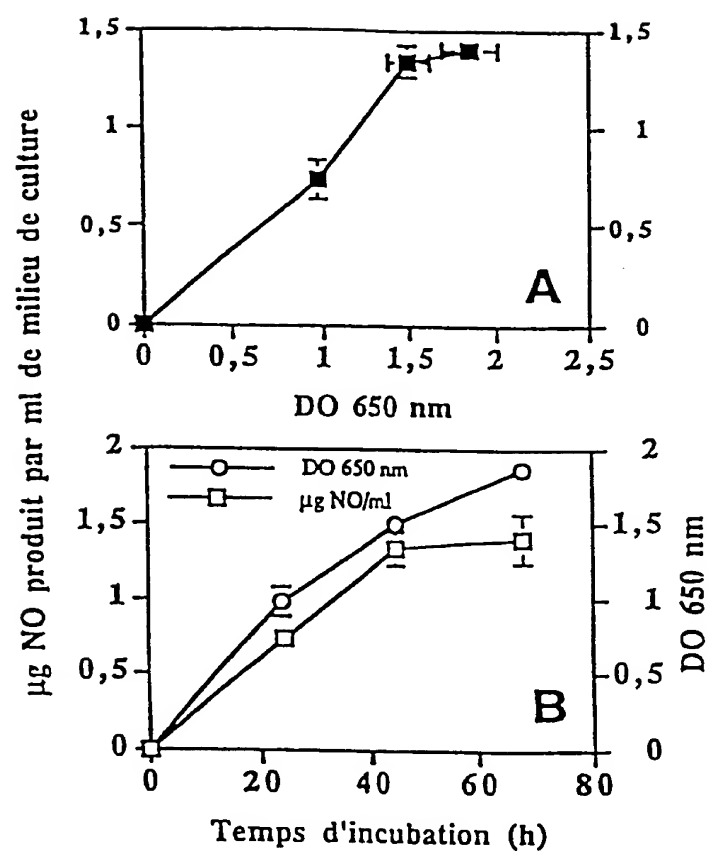


Figure 7

6/12

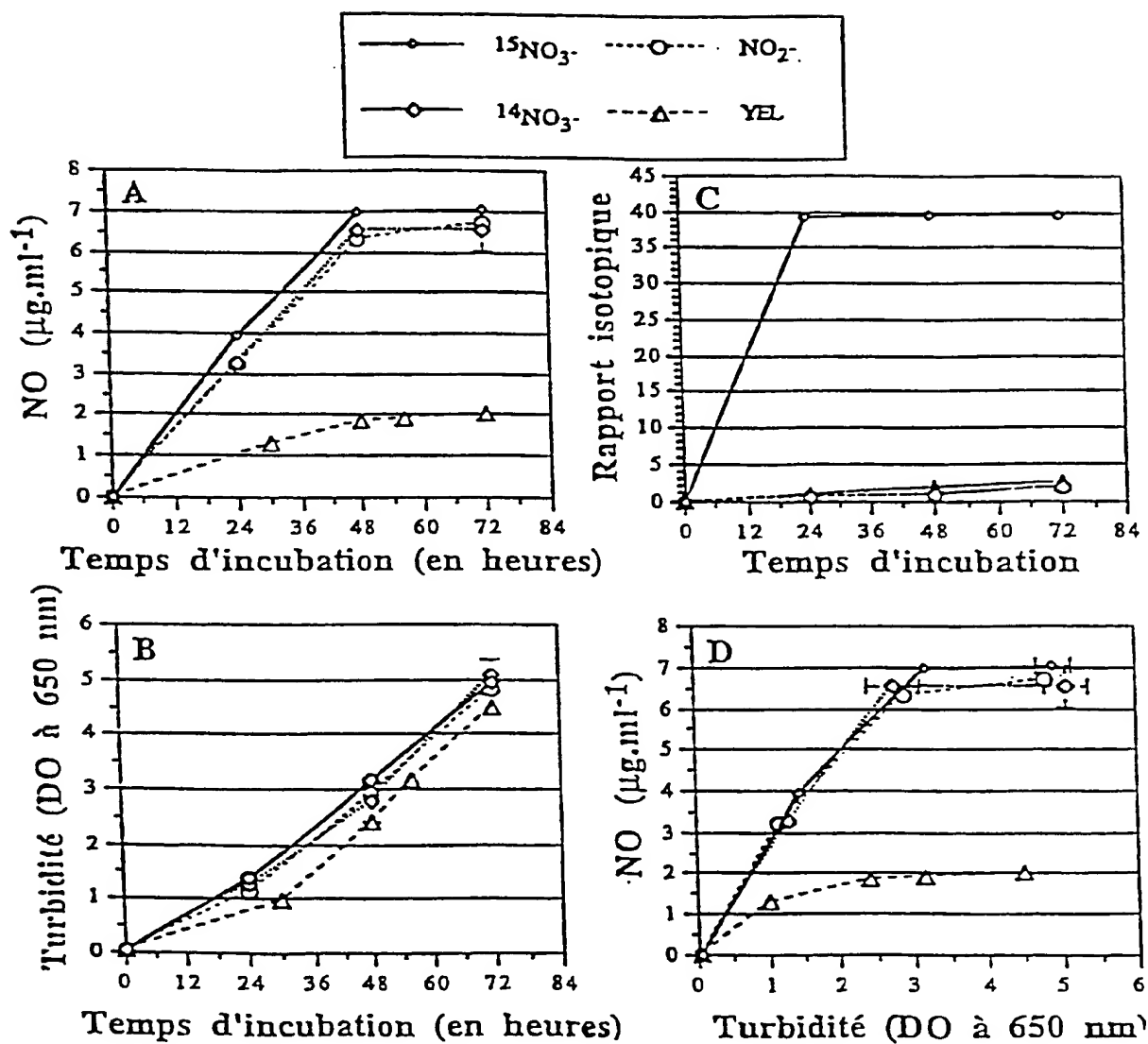


Figure 8

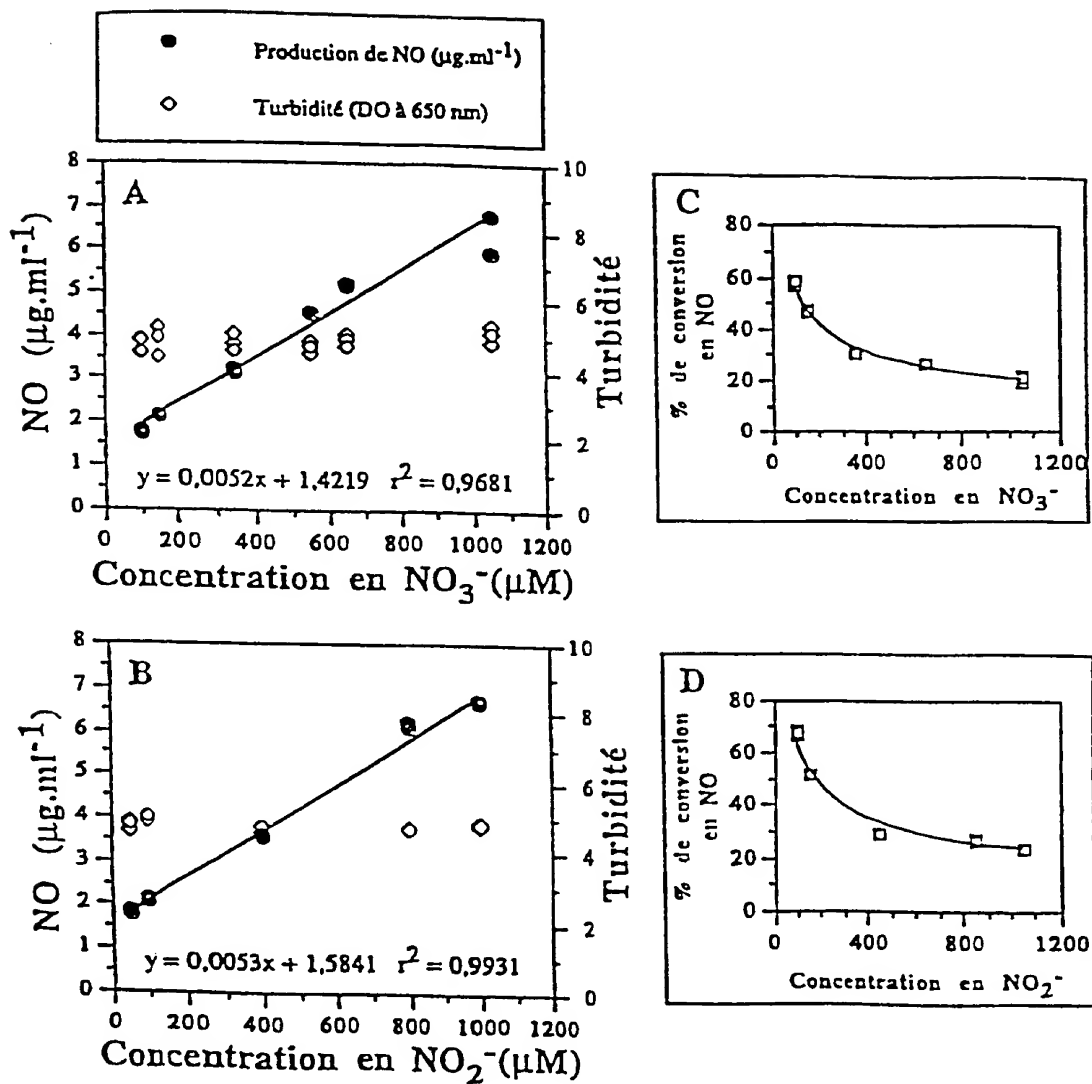


Figure 9

8/12

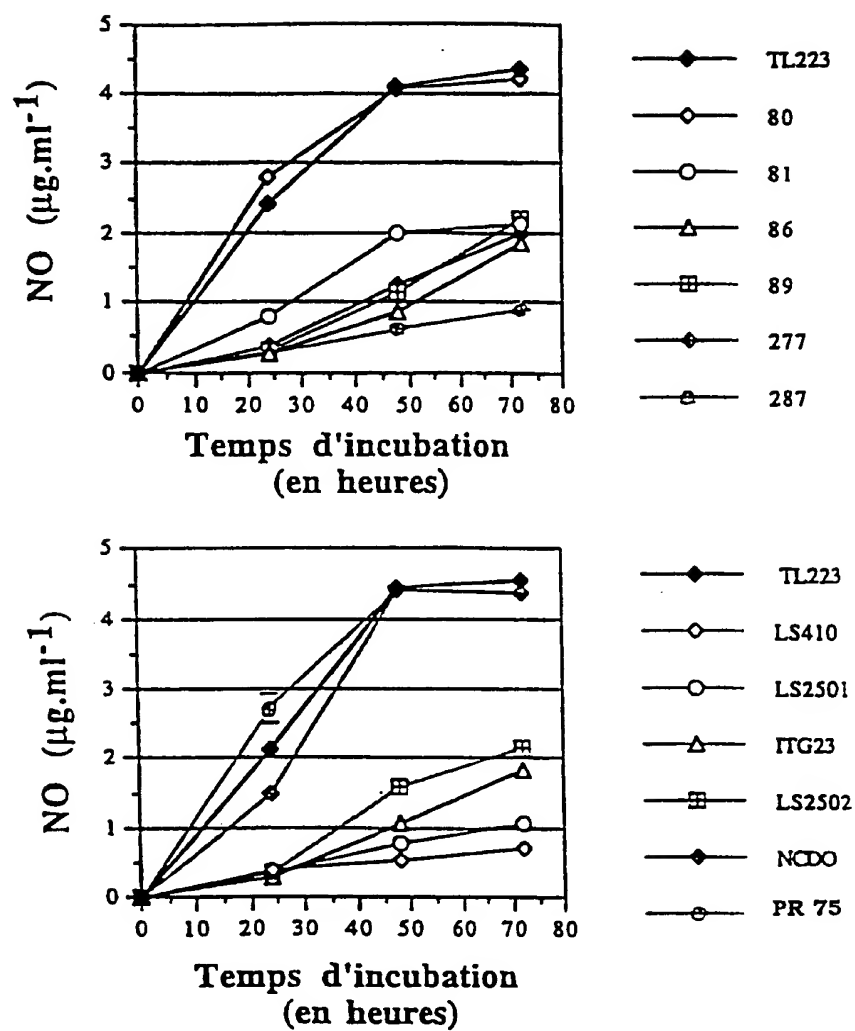


Figure 10

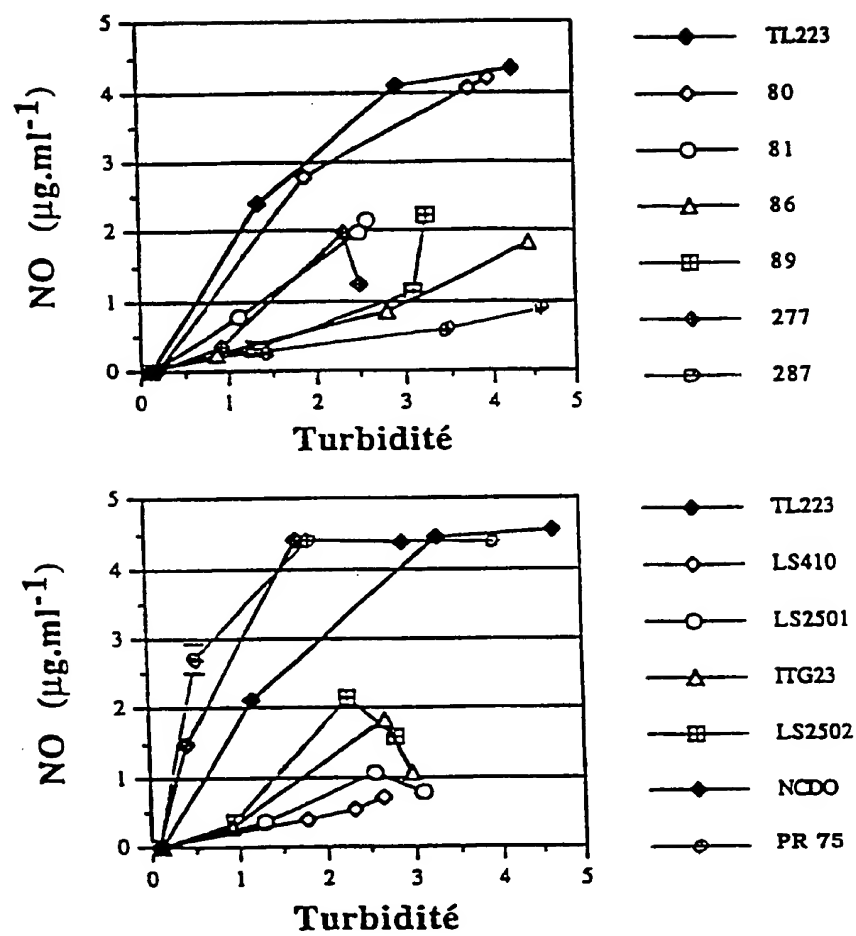


Figure 11



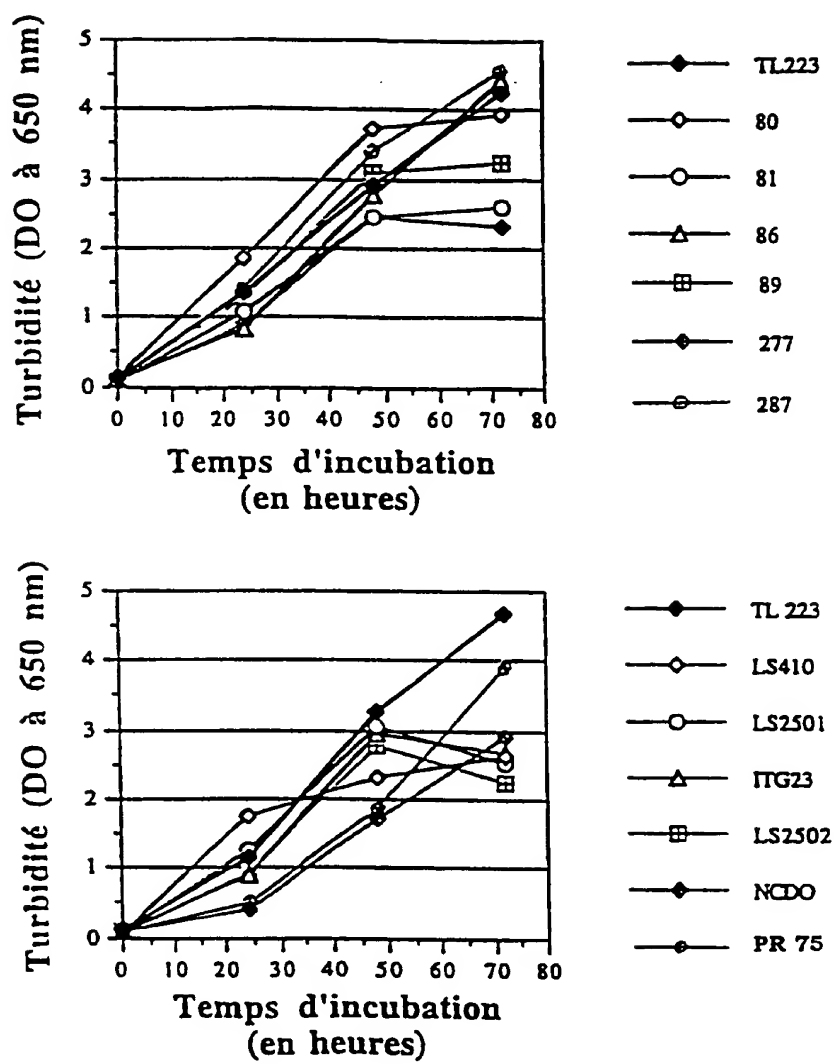


Figure 12

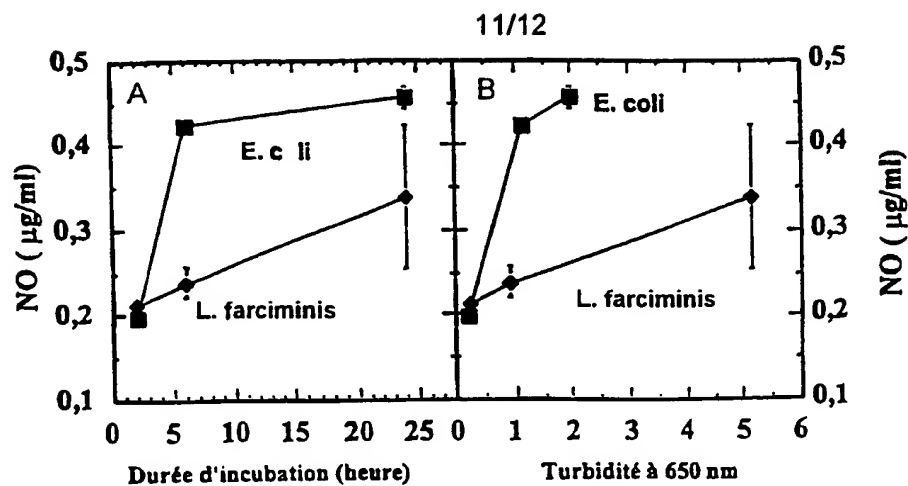


Figure 14

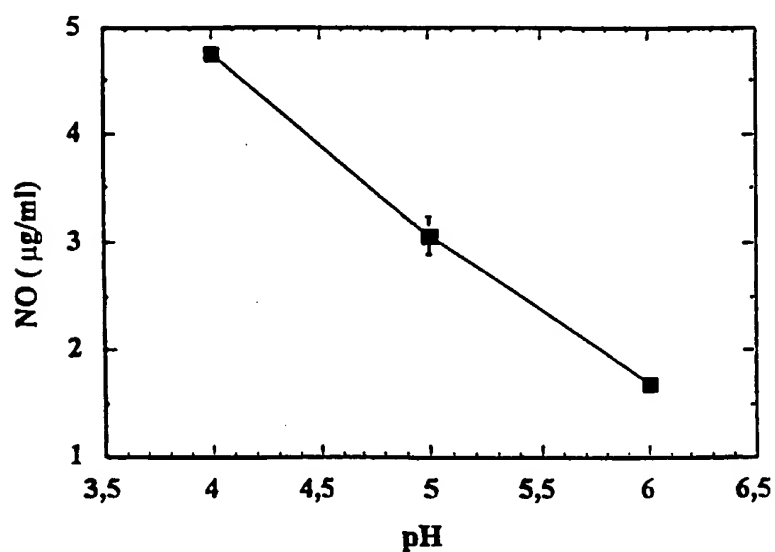


Figure 13

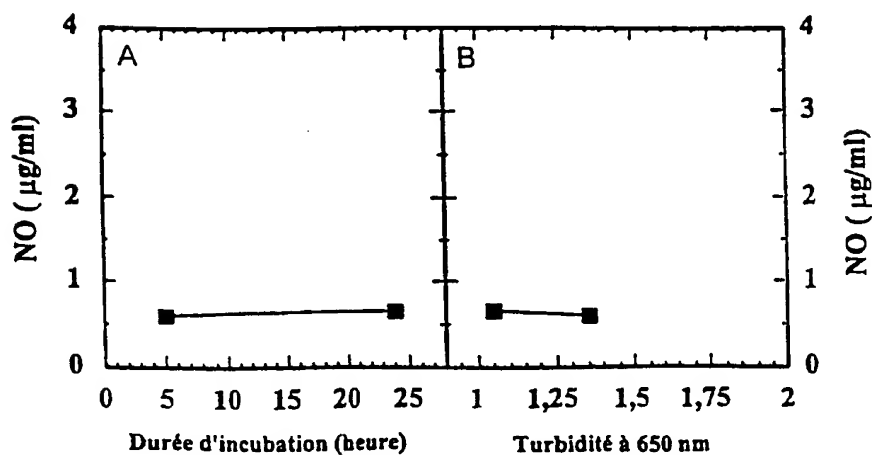


Figure 15

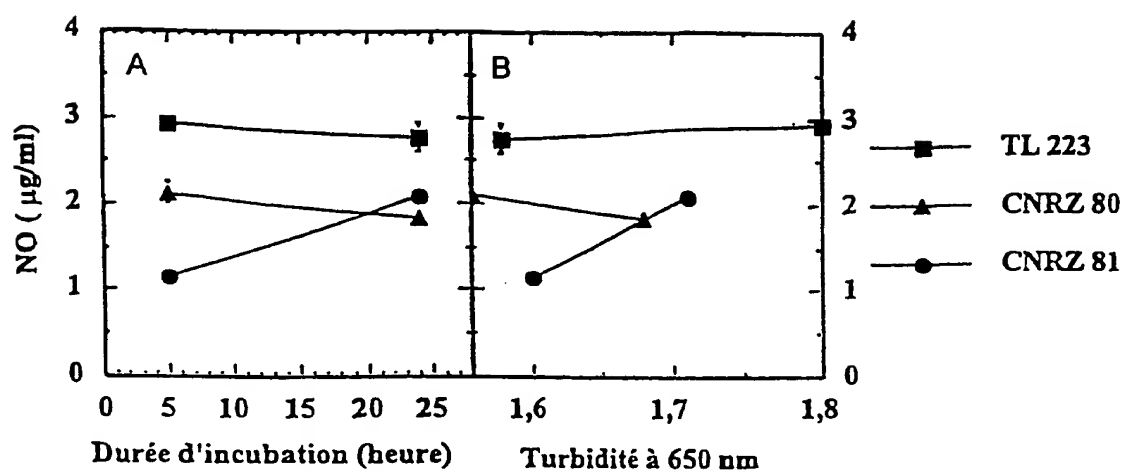


Figure 16

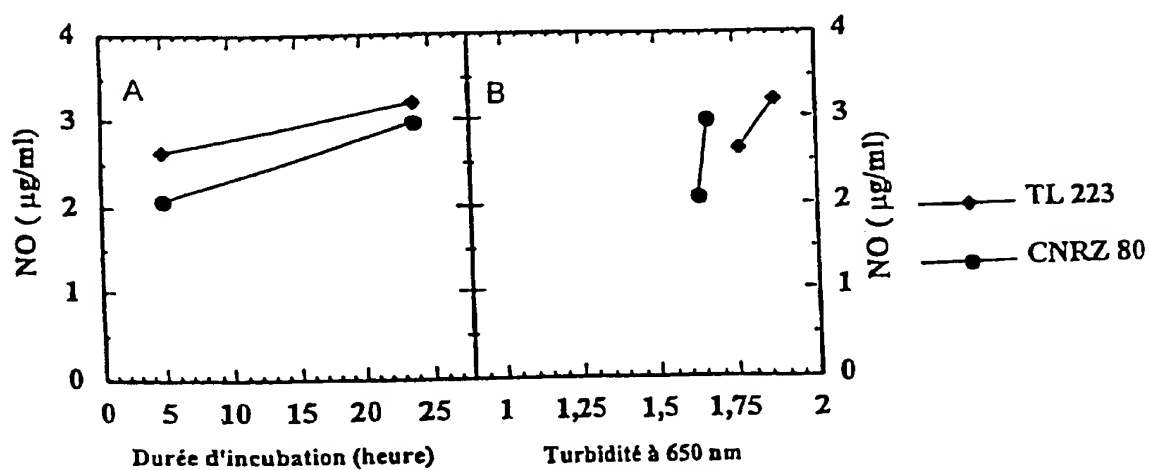


Figure 17